مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹

القا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطان انسانی A549 به‌واسطه عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)

الهام حویزی .M.Sc[۱]، فاطمه پورعطار[۱]، مهناز کسمتی .Ph.D[۱*]، علی شهریاری [۲]

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اهواز، ایران
۲- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، اهواز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول m.kesmati@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۷

چکیده

هدف: هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات سمی و اکسیداتیو عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی بر سلول‌های سرطانی رده A549 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی غلظت‌های عصاره مریم‌گلی، سلول‌ها در ظروف مخصوص کشت و سنجش MTT برای تعیین IC50 و توان زیستی سلول در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. هم‌چنین برای بررسی اثرات تیمار غلظت IC50 بر القای آپوپتوزیس، از سنجش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز دخیل در مسیر استرس اکسیداتیو و رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج استفاده شد. به‌علاوه، از رنگ‌آمیزی گیمسا و IPAD به‌منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول و هسته استفاده شد.

نتایج: غلظت IC50 عصاره مریم‌گلی برای سلول‌های A549 ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. براساس نتایج، عصاره مریم‌گلی به‌صورت معنی‌داری تاثیر سیتوتوکسیک بیش‌تری بر رده سلولی A549 در مقایسه با نمونه کنترل داشت. سلول‌های A549 تحت تیمار با عصاره، در زمان‌های مختلف تفاوت بارز و وابسته به دوزی را نشان دادند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی‌ها، تاییدی بر القای آپوپتوزیس در گروه تیمار بود. هم‌چنین نتایج بیان آنزیمی نشان داد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج فوق، عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی ضمن القا فعالیت آنتی اکسیدانتی، اثر آپوپتوتیک قابل ملاحظه‌ای به‌صورت وابسته به دوز و زمان بر سلول‌های سرطانی ریه دارد.

واژگان کلیدی: سرطان ریه، مریم‌گلی، آپوپتوزیس، استرس اکسیداتیو

مقدمه

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ در جوامع توسعه یافته و کمتر توسعه یافته است به‌طوری‌که انتظار می‌رود با رشد و افزایش سن جمعیت در کشورهای کمتر توسعه یافته که تقریبا ۸۲ درصد از جمعیت جهان را شامل می‌شوند، مرگ و میر ناشی از سرطان افزایش یابد (۱).

سرطان ریه یکی از مرگ‌بارترین نوع این بیماری برای مردان و زنان است و بدون در نظر گرفتن جنسیت، از نظر شیوع انواع سرطان دومین رتبه و هم‌چنین از نظر میزان کشندگی اولین رتبه در جهان را داراست (۲). سرطان ریه براساس اندازه و بروز سلول‌های بدخیم به دو گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شود که شامل سرطان ریه با سلول‌های کوچک (SCLC) که ۱۵ درصد از موارد سرطانی را شامل می‌شود و سرطان ریه با سلول‌های غیرکوچک (NSCLC) که ۸۵ درصد موارد باقیمانده را در بر می‌گیرد و خود به سه زیرگروه پاتولوژیکی عمده تقسیم می‌شود که شامل: ۱- سلول‌های کارسینومای سنگ‌فرشی ۲- سلول‌های آدنوکارسینوما و ۳- کارسینومای ریه با سلول‌های بزرگ می‌باشند. درمان سرطان ریه بستگی به نوع سلول سرطانی، وضعیت بیمار و مقدار پیشرفت آن دارد. طی دهه‌های اخیر معمولا از روش‌های شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی برای بهبودی بیماران استفاده شده است. جراحی زمانی موثر است که تومور به‌طور کامل قابل برداشت باشد و بیمار تحمل عمل جراحی را داشته باشد. بنابراین ابداع راه‌کارهای درمانی جدید و بدون عوارض جانبی، ضروری به‌نظر می‌رسد (۳، ۴). یکی از روش‌های موثر در کنترل سرطان، القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌باشد. آپوپتوزیس یک فرآیند کلیدی در بیماری سرطان است و توانایی فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوزیس و ادامه‌ی تکثیر یکی از ویژگی‌های اولیه‌ی سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود و بنابراین توانایی القای آپوپتوزیس در این سلول‌ها یک هدف اصلی و مهم در درمان سرطان می‌باشد (۵). فرآیند آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول به‌عنوان روشی حفاظت شده و تحت کنترل ژن‌هاست که به‌منظور حذف سلول‌های ناخواسته در موجودات زنده به‌کار می‌رود. این فرآیند در تنظیم میزان رشد، تکثیر سلول‌ها، تکوین و سلامت بدن بسیار مهم است (۶). هم‌چنین با وجود این‌که عوامل متعددی در ایجاد و پیشرفت سرطان دخیل می‌باشند، اخیرا نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی انواع سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است. شواهد متعددی حاکی از آن است که سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال، گونه‌های فعال اکسیژن بیشتری تولید می‌کنند و در معرض استرس اکسیداتیو قرار دارند. در سلول‌های سرطانی سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی سرکوب می‌شود و یا مقادیر زیادی گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود. شواهد بسیار زیادی نشان داده‌اند که تعادل اکسیداسیون احیا در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی مختل می‌شود. تغییر در سطوح آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و آنتی اکسیدانت‌های غیرآنزیمی (گلوتاتیون، ویتامین C و تیوردوکسین) و هم‌چنین تغییراتی در مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط، مشهود است (۷).

از سوی دیگر داروهای گیاهی به‌علت وجود عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، اهمیت بیش‌تری در پیشگیری انواع سرطان دارند (۸). بدین منظور مطالعات گسترده‌ای بر روی گیاهان مختلف صورت گرفته و اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی آن‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. در این خصوص، سنجش میزان بقا و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضدسرطانی بر روی سلول‌ها امری مهم به‌نظر می‌رسد؛ که در این خصوص روش‌های متعددی استاندارد شده است. گیاه مریم‌گلی با نام علمی *Salvia officinalis* گیاهی است گلدار، نهاندانه، دو لپه‌ای پیوسته گلبرگ، بوته‌ای با ریشه‌های چوبی و پایا به ارتفاع ۳۰ الی ۶۰ سانتی‌متر، برگ‌هایی ساده و از تیره‌ی نعناع، بومی مناطق خاورمیانه و مدیترانه است که امروزه در سراسر جهان رایج شده است (۹). این گیاه به‌دلیل خواص و طعم منحصر به‌فرد آن در بسیاری از غذاها و به‌عنوان

دم‌نوش مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طب سنتی آسیا و آمریکای لاتین از مریم‌گلی برای درمان انواع اختلالاتی مانند تشنج، زخم، التهاب و اسهال و در اروپا نیز برای درمان اختلالات شناختی مرتبط با سن استفاده می‌کنند. مریم‌گلی آلزایمر را بهبود می‌بخشد و قند خون را کاهش می‌دهد. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در خصوص پیدا کردن اثرات زیستی جدید برای مریم‌گلی انجام شده است، که این مطالعات طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی شامل اثرات آنتی اکسیدانتی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضددردی را نشان می‌دهد و اجزای شیمیایی موجود در عصاره‌های آبی و هیدروالکلی این گیاه مانند سینئول، پنین، فلاونوئیدها به‌خصوص رزمارینیک اسید، ساپونین‌ها، ویتامین‌های E و C و غیره را مسئول این اثرات زیستی می‌دانند (۱۰، ۱۱).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد رزمارینیک اسید، یکی از ترکیبات مریم‌گلی می‌تواند پیشرفت تومور در چندین اندام بدن شامل کولون، سینه، کبد، شکم و هم‌چنین ملانوما و سلول‌های سرطان خون را سرکوب کند. این ماده هم‌چنین می‌تواند فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش دهد (۱۲). با توجه به اهمیت سرطان ریه و خاصیت آنتی اکسیدانتی مریم گلی، اطلاعات چندانی در خصوص اثر این داروی گیاهی در آزمایشات درون و برون تنی سلول‌های سرطانی ریه مشاهده نشد. هم‌چنین در سال ۲۰۲۰ ونگ و همکاران اعلام داشتند که درمان ترکیبی دارویی به‌نام پالکی‌تاکسل با کربوپلاتین در درمان نوعی سرطان ریه پیشرفته موفق‌آمیز بوده و برای درمان کلینیک پیشنهاد شد. پالکی-تاکسل از جمله دارویی از دسته آلکالوئیدهای گیاهی بوده که عموما از گیاه سرخدار مشتق می شود و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات طبیعی ضدسرطان در سرارسر دنیا برای درمان از جمله سرطان پوست، مری و ریه به‌طور موثر استفاده می‌شود (۳۱). به‌علاوه نشان داده شده که داروهایی با منشا گیاهی مانند وین بلاستین و اتوپوساید همراه با ترکیبات سیکلوپلاتین نقش چشم‌گیری در درمان سرطان ریه با منشا سلول‌های کوچک دارد. اتوپوساید جز داروهای ضروری سازمان بهداشت است که از جمله موثرترین و بی‌خطرترین داروها در ارتباط با سلامت هستند (۴۱). وین بلاستین یک ترکیب آلکالوئید با خاصیت **ضد**نئوپلاسم است که در درمان انواع خاصی از سرطان از جمله سرطان ریه به‌کار می‌رود (۵۱، ۶۱).

لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی در دوزهای مختلف در القای آپوپتوزیس و هم‌چنین میزان القای آنزیم‌های موثر بر استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی ریه رده A549 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های رده A549: سلول‌های A549 از موسسه پاستور تهران به‌صورت سلول کشت شده در فلاسک خریداری شد. پس از این‌که تراکم سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS, (Gibco, USA) به‌حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید به‌منظور مضاعف‌سازی سلول‌ها پاساژ سلولی به‌این‌ترتیب انجام گرفت که محیط رویی فلاسک خارج و سطح رویی سلول‌ها با ۲ میلی‌لیترASU ,amgiS( ) SBP شسته شد آنگاه به‌هر فلاسک 52T حدود ۲ میلی‌لیتر تریپسین ASU ,ocbiG( ) اضافه و ۱ الی ۲ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. در ادامه ۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت به فلاسک اضافه و محتویات فلاسک به فالکون ۵۱ میلی‌لیترمنتقل و با دور mpr ۰۰۵۱ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

طرز تهیه عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی: پودر عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی (سها جیسا، ایران) را به‌میزان ۵۰۰ میلی‌گرم وزن کرده و با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (modification of Basal Medium Eagle) فاقد سرم ترکیب و به‌شدت تکان داده شد تا پودر کاملا در محیط کشت حل شود. سپس زیر هود لامینار با فیلتر سر سرنگی با قطر

منافذ ۰/۲۲ میکرون در فالکون ۱۵ سی‌سی فیلتر شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌عنوان استوک اصلی بـا غلظـت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نگه‌داری شد.

ساخت محلول MTT: برای ساخت محلول MTT، ۲۵ میلی‌گرم از پودر MTT (Sigma, USA) در ۵ میلی‌لیترسالین بافرفسفات حل و با فیلتر سرسرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد و در دمای ۰۲- درجه سانتی‌گراد به‌عنوان استوک اصلی نگه‌داری شد.

انجام تست MTT: بدین منظور سلول‌های مورد نظر در تراکم ۱×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک، در ظرف کشت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط رویی هر چاهک با غلظت‌های عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۳ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعویض که همراه با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به چاهک‌ها اضافه شد. برای نمونه کنترل سلول‌ها در محیط کشت و بدون تیمار با مریم گلی درنظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار محیط رویی خارج و هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر PBS شست‌وشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۹ قسمت محیط کشت و ۱ قسمت محلول MTT) به‌هر چاهک اضافه شد و پلیت به‌مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محتویات هر چاهک با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان به‌هر چاهک اضافه شد. محتویات هر چاهک به‌آرامی با سمپلر پیپتاژ شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای انکوباتور نگه‌داری شد. در ادامه جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا (FAX STAT 2100, USA) خوانده شد. این تست در روزهای ۱، ۳، ۵، و ۷ انجام شد.

رنگ آمیزی سلول‌ها با روش گیمسا: به‌منظور رنگ‌آمیزی گیمسا پس از ۲۴ ساعت تیمار سلولی با غلظت IC50 از عصاره‌ی هیدروالکلی انجام شد. سلول‌ها پس از شست‌وشو با PBS به‌وسیله‌ی اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر متانول (مخلوطی از استیک اسید و متانول با نسبت ۱ به ۳) به‌مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. آن‌گاه میزان ۱۰۰ میکرولیتر رنگ گیمسا با غلظت ۴ درصد به سلول‌ها اضافه و پس از گذشت ۲۰ دقیقه شست‌وشو با PBS انجام شد. سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Biored, USA) مشاهده و عکس‌برداری شدند.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید: ابتدا سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه کشت و تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار به نمونه‌ها محلول اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پس از گذشت ۵ دقیقه به‌وسیله‌ی میکروسکوپ فلوئورسانس (Olympus, Japan) مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت.

رنگ آمیزی DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride): به‌منظور رنگ‌آمیزی دپی (Sigma, USA) سلول‌ها در ظروف مخصوص ۹۶ خانه کشت و تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با پارا فرمالدهید ۴ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند و پس از شست‌وشو به‌مدت ۱ الی ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ دپی قرار داده شدند در نهایت پس از شست‌وشو با میکروسکوپ فلوئورسانس بررسی شدند.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی: برای بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در رده‌ی سلولی A549 ابتدا سلول‌ها در فلاسک‌های سلولی به‌تعداد ۹×۱۰^{۵} سلول کشت داده شد و با غلظت IC50 مریم گلی به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس با استفاده از تریپسین EDTA جدا و ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده سرد به رسوب سلول‌ها اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگه‌داری شد. بعد از گذشت این زمان نمونه‌ها ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در آخر محلول رویی حاصل جهت

اندازه‌گیری میزان پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌روش دستی با استفاده از روش کونو و میزان فعالیت کاتالاز نیز به‌روش کورولیوک و همکاران انجام شد (۱۶).

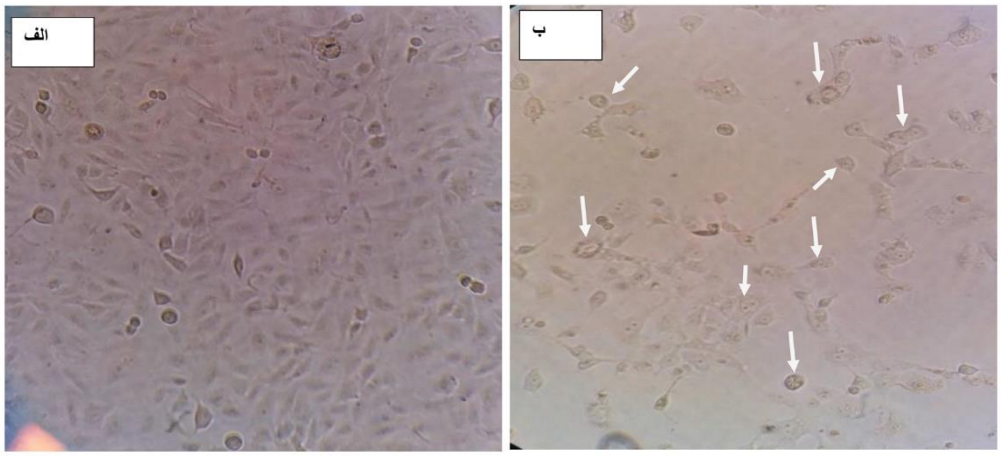
تحلیل آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism، آزمون one-way ANOVA و T-test انجام شد. رسم نمودار در Excel 2016 انجام گرفت. $p<۰/۰۵$ برای سطح اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد و هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.

نتایج

بررسی مورفولوژی سلولی در رده‌ی سلولی A549

یکی از روش‌های بررسی اثرات سمیت بر روی سلول‌ها، مشاهده مورفولوژی سلولی می‌باشد. بدین منظور بعد از کشت رده سلولی A549 در پلیت ۹۶ خانه و تیمار با غلظت IC50 از عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی پس از ۲۴ ساعت نمونه‌های تیمار و کنترل با میکروسکوپ معکوس مشاهده و عکس‌برداری شدند. در مورفولوژی سلولی گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل تغییراتی مشاهده شد که شامل کروی شدن سلول، چروکیده شدن، جمع شدن سلولی و دانه دار شدن سلول‌ها بود (شکل۱).

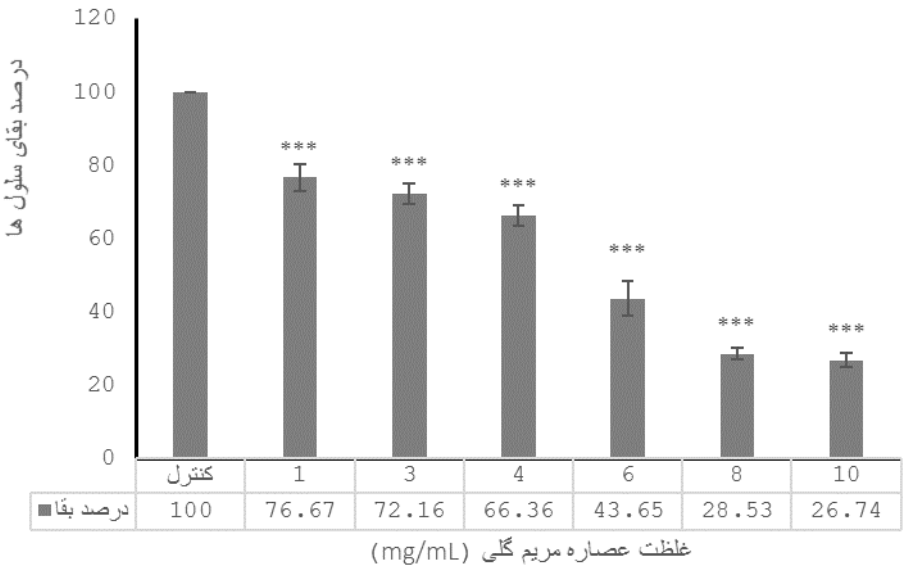


شکل۱: مورفولوژی رده سلولی A549 (۲۰×): در تصویر "الف"، مورفولوژی طبیعی سلول‌های A549 بدون تیمار قابل مشاهده می‌باشد. در تصویر "ب"، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت ۵ mg/mL عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی نشان داده شده است. کاهش حجم سلول، گرانوله شدن سلول‌ها و همچنین چروکیده شدن غشا سلول‌ها در نمونه تیمار قابل مشاهده می‌باشد که به‌واسطه فلش در تصویر مشخص شده‌اند.

اثر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی روی بقای رده سلولی سرطان A549

آزمایش MTT جهت بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی بر زیست‌پذیری سلول‌های A549 در زمان ۲۴ ساعت و با غلظت‌های (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۳ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انجام شد. نتایج آماری نشان داد که زیست‌پذیری سلول‌های A549 بعد از مواجهه با دوزهای مختلف عصاره‌ی مریم‌گلی به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش یافت به‌طوری‌که بقای سلولی به‌ترتیب به‌میزان (۲۶/۷۴، ۲۸/۵۳، ۴۳/۶۵، ۶۶/۳۶، ۷۲/۱۶ و ۷۶/۶۷ درصد) رسید (شکل۲). زیست‌پذیری سلول‌های

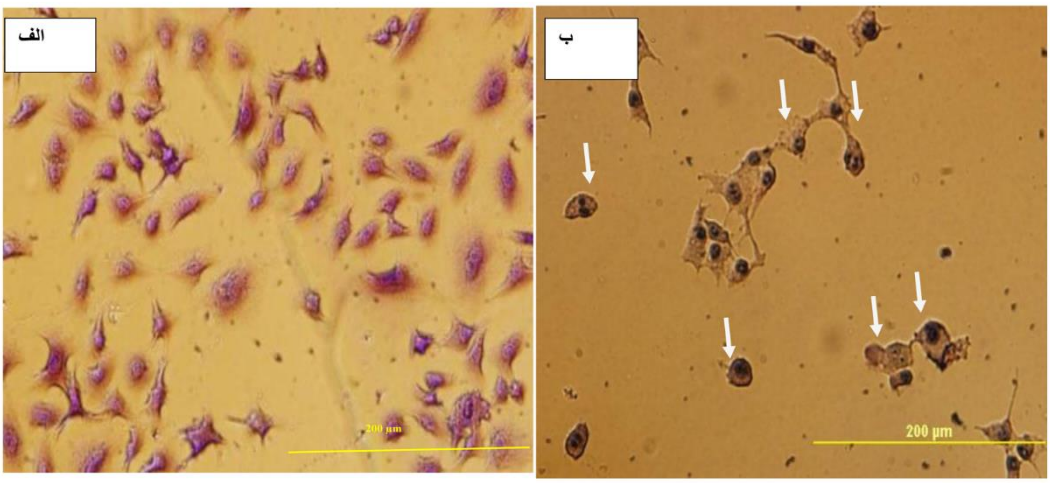
A549 در تمامی دوزها دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود و IC50 به‌دست آمده برای سلول‌های A549 در دوز ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.



شکل ۲: نمودار اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی مری‌م‌گلی بر زی‌ست‌پذیری سلول‌های A549 در زمان ۲۴ ساعت.
نتای‌ج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey به‌صورت MEAN±SEM بیان شد ($p< ۰/۰۰۱$)
××× نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار درصد بقای گروه‌های تیمار با کنترل در سطح ($p< ۰/۰۰۱$) است.
IC50 به‌دست آمده برای سلول‌های A549 در دوز ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (n=۳).

رنگ آمیزی سلول‌های A549 با رنگ گیمسا

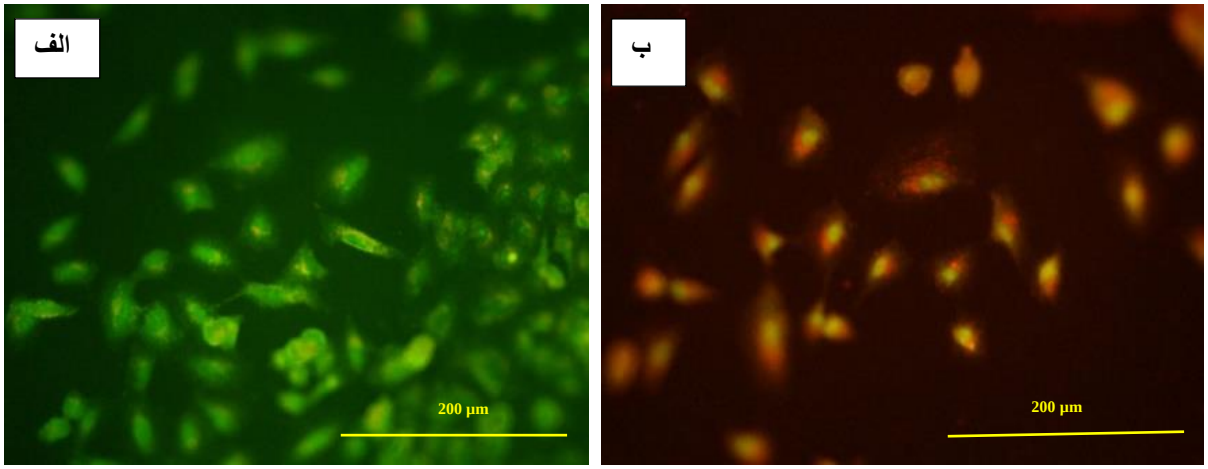
پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلولی، سلول‌ها با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده و به‌وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. مورفولوژی سلول‌ها پس از این مدت در نمونه‌ی شاهد کاملا طبیعی بود به‌طوری‌که، سلول‌ها کاملا کشیده با غشای سالم و برخی در حال تقسیم دیده شدند. اما سلول‌های تحت تیمار تغییرات مورفولوژیکی شامل چروکیدگی سیتوپلاسم سلولی، کاهش حجم سلولی، گرانوله شدن سلول‌ها، از دست دادن چسبندگی سلولی و جدا شدن تعدادی از سلول‌ها از کف چاهک و شناور بودن در محیط سلولی، تراکم کروماتین درون هسته و تولید اجسام آپوپتوزیسی را از خود نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳: رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا در رده سلولی A549 (۲۰×): درتصویر "الف" مورفولوژی طبیعی سلول‌های A549 بدون هیچ تیمار ویژه‌ای، به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی گیمسا قابل مشاهده می‌باشد. در تصویر "ب"، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت IC50، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی نشان داده شده است. در نمونه تیمار چروکیدگی سیتوپلاسم سلولی، کاهش حجم سلولی، گرانوله شدن سلول‌ها، تراکم کروماتین درون هسته قابل مشاهده می‌باشد که با فلش در شکل مشخص شده‌اند.

رنگ آمیزی رده‌ی سلولی A549 با روش اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید

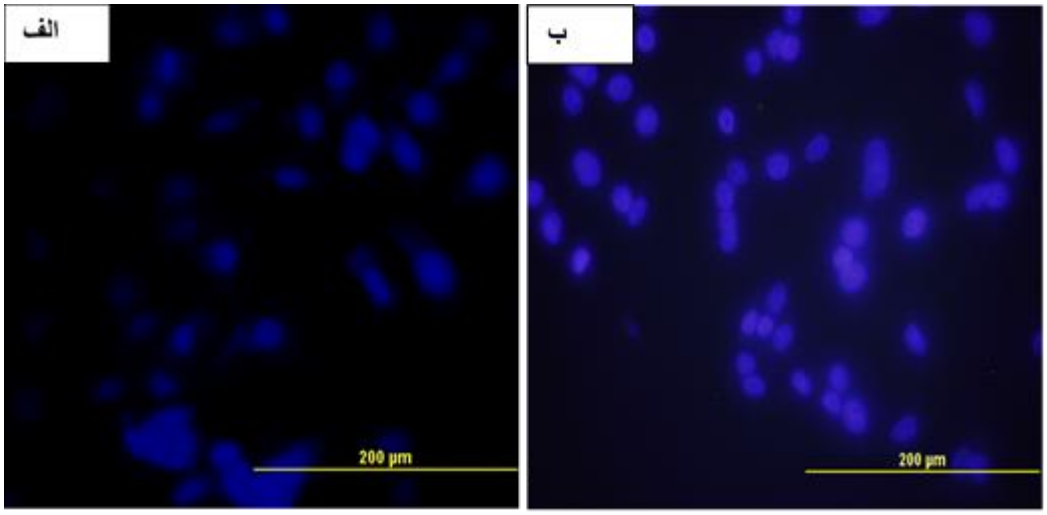
به‌منظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی در رده سلولی A549 از روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید استفاده شد. اکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود. اکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می‌شود و در زیر میکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می‌دهد. اما اتیدیوم بروماید فقط سلول‌های آسیب دیده و آپوپتوزی را رنگ می‌کند. اتیدیوم بروماید وارد DNA سلول آسیب‌دیده شده و در زیر میکروسوپ فلوئورسانس، رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد. در گروه‌های تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی و تعداد سلول‌ها با کروماتین رنگ نارنجی افزایش چشم‌گیری در مقایسه با کنترل داشتند (شکل ۴).



شکل ۴: رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید رده سلولی A549 (۴۰×): در تصویر" الف"، که نشان‌دهنده‌ی گروه کنترل است، بیشتر سلول‌ها سبز رنگ می‌باشند و در حالت نرمال قرار دارند. در تصویر "ب"، سلول‌ها پس از تیمار با غلظت IC50، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی نشان داده شده‌اند. در نمونه تیمار تعداد کمی از سلول‌ها زنده با کروماتین سبز رنگ و بیشتر آن‌ها سلول‌های آپوپتوزی با کروماتین نارنجی رنگ با تراکم بالا و قطعه قطعه شده قابل مشاهده می‌باشد.

رنگ‌آمیزی سلول‌های A549 با رنگ دپی

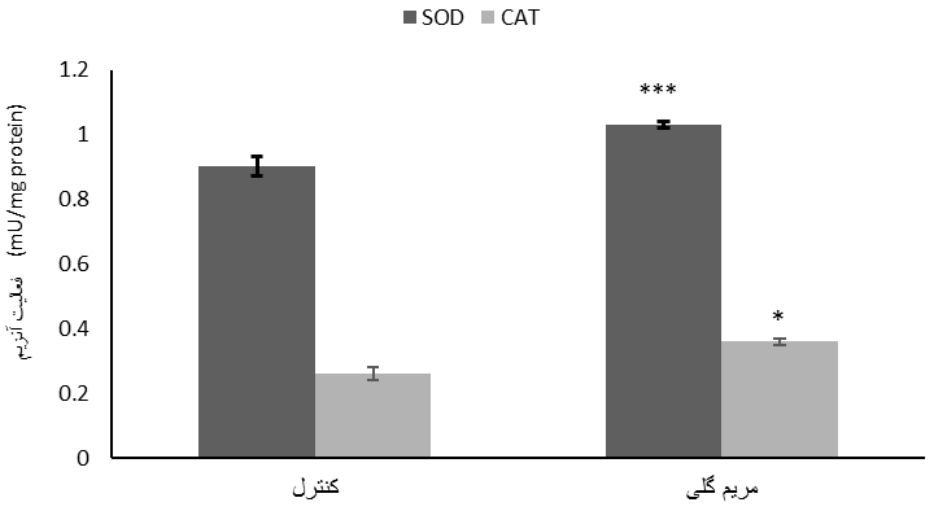
به‌منظور بررسی تغییرات هسته در سلول‌های A549 حاصل از تیمار با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی این سلول‌ها با رنگ دپی رنگ‌آمیزی شدند. 4′,6-diamidino-2-phenylindole یک رنگ فلوئورسنت است که برای مشاهده هسته سلول به‌کار می‌رود و می‌تواند اتصال قوی و محکمی با ناحیه بازهای A-T در دو رشته DNA برقرار کند. در گروه‌های سلولی تیمار عصاره مریم‌گلی تغییراتی مانند چروک خوردن هسته‌ی سلولی، کروماتین فشرده و یا قطعه قطعه دیده شد. این تغییرات از خصوصیات سلول‌های آپوپتوزیسی می‌باشد و نشان‌دهنده‌ی آغاز روند مرگ سلول‌ها در گروه‌های تیمار بود. در حالی‌که در گروه کنترل، هسته سلولی کاملا گرد و سالم دیده می‌شد (شکل ۵).



شکل۵: رنگ‌آمیزی دپی رده سلولیA549 (۴۰×): درتصویر "الف" مورفولوژی طبیعی هسته سلول‌های A549 بدون هیچ تیمار ویژه‌ای، به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی دپی قابل مشاهده می‌باشد. در تصویر "ب"، تغییرات مورفولوژیکی هسته سلول‌ها پس از تیمار با غلظت IC50، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی و رنگ‌آمیزی دپی، نشان داده شده است. در نمونه تیمار چروک خوردن هسته‌ی سلولی و کروماتین فشرده و قطعه قطعه قابل مشاهده می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در رده سلولی *A549*

با محاسبه‌ی میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه کنترل و گروه تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی با غلظت IC50 و آنالیز آماری پس از آن، نمودار آن رسم شد (شکل۶). نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و همچنین آنزیم کاتالاز در گروه تیمار با عصاره مریم‌گلی در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد ($p<۰/۰۰۱$).



نمودار۶: مقایسه فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گروه‌های کنترل و تیمار با مریم گلی در سلول‌های A549 نتایج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و t-test به‌صورت MEAN±SEM بیان شد (n=3).

*** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم گروه تیمار با کنترل در سطح ($p< ۰/۰۰۱$) است.

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم گروه‌های تیمار با کنترل در سطح ($p< ۰/۰۵$) است.

بحث

در این مطالعه اثرات سمیت سلولی عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی بر رده‌ی سلولی سرطان آدنوکارسینوما ریه مورد بررسی قرار گرفت. زیستایی و تکثیر سلول‌ها توسط روش MTT بررسی شد. در این روش ابتدا رده‌ی سلولی سرطانی در مواجهه با غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی قرار گرفت. تیمار مریم گلی دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلول سرطانی A549 به‌صورت وابسته به‌دوز بود، به‌گونه ای که در غلظت‌های پایین تیمار رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل، تغییر کمتری یافته بود اما در غلظت‌های بالاتر به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد. با توجه به نتایج، غلظت موثر بر مهار ۵۰ درصد رشد سلول‌ها IC50، برای عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی بر رده‌ی سرطانی A549 ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. از سوی‌دیگر، غلظت IC50 در نمونه تیمار در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷، رشد رده‌ی سلولی را به‌طور معنی‌داری با گذشت زمان کاهش داد، که نشان‌گر وابسته به زمان بودن اثر سمیت عصاره بر روی سلول‌های سرطانی بود. به‌علاوه نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و همچنین آنزیم کاتالاز در گروه تیمار با عصاره مریم‌گلی در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش داشت.

هم‌راستا با پژوهش ما پژوهش‌های قبلی نیز حاکی از آن می‌باشد که عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی بر برخی سلول‌های سرطانی طی شرایط وابسته به زمان و غلظت اثر سمیت سلولی دارند برای نمونه چرنوا و همکاران (۱۷، ۱۸) ، در تحقیقات خود نشان دادند که کامفور (یکی از ترکیبات موجود در عصاره‌ی مریم‌گلی)، سمیت را در سلول‌های کارسینومای سنگفرشی انسان HSC-2 القا می‌کند. جیانگ و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره‌ی اتانولی از برگ گیاه مریم‌گلی توانست تکثیر سلول‌های سرطانی کبد HepG2 را به‌صورت وابسته به دوز و زمان مهار کند. از طرف‌دیگر این عصاره میزان زنده ماندن سلول‌های نرمال کبد WRL-68 را در طی ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری تغییر نداد؛ که نشان‌دهنده‌ی این است که سلول‌های 2HepG به اثرات سمیت سلولی بسیار حساس‌تر بودند (۹). هم‌چنین گارسیا و همکاران (۱۹) به بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی بر روی رده‌های سلولی توموری و غیرتوموری پرداختند. نتایج حاصل نشان داد که عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی بر رده‌های سلولی سرطانی خاصیت انتخابی بودن را دارد. در مطالعات اخیر گوزل و همکارانش از عصاره الکلی مریم گلی در شرایط درون تنی و برون تنی استفاده کردند و نتایج آن‌ها تاکید کننده فعالیت آنتی اکسیدانتی قابل توجه مریم گلی بود (۲۰). همچنین در مطالعه دیگر ژو و همکاران (۲۱) سالویانولیک اسید را به‌عنوان مشتقی با فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی و کاهنده گونه‌های فعال اکسیژن از گیاه مریم گلی جدا ساخته و به‌بررسی خواص آنتی اکسیدانتی آن در شرایط درون تنی پرداختند و نتایج آن‌ها تاکید کرد که این ترکیب دارای اثرات آنتی اکسیدانتی بالایی می‌باشد و در همین راستا برخی محققین گیاه مریم گلی را به‌عنوان گیاهی با خواص فروانی زیستی از جمله آنتی اکسیدانتی، ضدمیکروبی، ضدالتهاب و ضدسرطان معرفی کردند (۱۱، ۲۲). به‌علاوه در مطالعه‌ای فعالیت سمیت سلولی عصاره‌ی متانولی گیاه مریم‌گلی را بر رده‌های سلولی سرطانی ijaR، U937 و KG-1A و سلول‌های غیرسرطانی HUVEC سنجیدند و نشان داده شده است که این عصاره می‌تواند به‌طور قابل توجهی تکثیر سلول‌های سرطانی را در محیط برون تنی سرکوب کند. این خواص ضدتکثیری عصاره‌ی مریم‌گلی به‌صورت وابسته به‌دوز و زمان و انتخابی بود. به‌گونه ای که در غلظت‌های ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیری بر تکثیر سلول‌ها نداشت (۲۳ و ۲۴). در همین راستا ما نیز در این مطالعه به تاثیر عصاره مریم گلی بر سلول‌های غیرسرطانی HUVEC پرداختیم و IC50 به‌دست آمده برای سلول‌های HUVEC در دوز ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. دلیل این سمیت بیشتر احتمالا سرعت بالای تکثیر این سلول‌ها نسبت به سلول‌های 945A است و احتمالا نقش سلول‌های HUVEC در رگ‌زایی و تاثیر مهار عصاره مریم گلی در رگ‌زایی و مهار رشد سلول‌های HUVEC باشد. اختلاف بین نتایج ما و آن‌ها می‌تواند با این واقعیت مرتبط باشد که ممکن است حساسیت سلول‌های سرطانی با هم تفاوت داشته باشد

و سمیت عصاره‌های مریم گلی وابسته به عوامل مختلف از جمله موقعیت جغرافیایی گیاه، بخشی از گیاه مورد استفاده برای آماده‌سازی عصاره‌ها و نوع استخراج است. بسیار جالب‌تر که حتی روش‌های خشک کردن گیاهان مورد استفاده برای آماده‌سازی این عصاره‌ها نیز موثر است. هم‌چنین ژانگ و همکاران (۲۵) گزارش دادند که رزمارینیک اسید در عصاره‌های آبی و هیدروالکلی مریم‌گلی یافت می‌شود. این ماده با کاهش Bcl-2 و بیان سایکلین D1 از فسفریلاسیون STAT3 جلوگیری کرده و باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های تومور HSCT6 و Caco-2 می‌شود. ترکیب دیگری که در هر دو عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی مریم‌گلی یافت می‌شود، کافئیک اسید است. مطالعات قبلی با استفاده از سلول A549 نشان دادند که کافئیک اسید می‌تواند با افزایش Bax و کاهش Bcl-2 آپوپتوزیس را در این سلول‌ها القا کند. یکی‌دیگر از ترکیبات مهم موجود در عصاره‌ی گیاه مریم‌گلی، اورسولیک اسید است. این ماده قادر بود تا آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطان رحم از طریق فعال‌سازی کاسپاز القا کند و منجر به کاهش گلیکوژن و سنتز پروتئین به‌وسیله‌ی فسفریلاسیون گلیکوژن سینتاز کیناز β3 شد (۲۶). این مولکول هم‌چنین از طریق افزایش سطح Bax ، کاهش Bcl-2 و آزادسازی سیتوکروم C به سیتوزول پتانسیل غشا میتوکندری را کاهش داد و مسیرهای آپوپتوز داخلی و خارجی را در رده‌ی سلولی سرطان سینه‌ی انسان فعال کرد (۲۷). به‌علاوه پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مرگ سلولی به فعالیت میتوکندری‌ها وابسته است، که در این میان گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندریایی به‌عنوان آغاز مسیر نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند. مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر مرگ سلولی آپوپتوتیک اغلب ناشی از باز نشدن منافذ MPT (انتقال نفوذپذیری میتوکندری) و عدم کارآیی در مسیر داخلی میتوکندریایی سیگنالینگ آپوپتوز است. نکته حائز اهمیت، بالابودن گونه‌های فعال اکسیژن درون سلول‌های سرطانی است که علی‌رغم این موضوع مهم به‌دلیل بسته بودن منافذ میتوکندری مسیرهای مرگ سلولی فعال نشده و سلول به بقای خود ادامه می‌دهد. بنابراین چنانچه بتوان تولید و خروج گونه‌های فعال اکسیژن درون میتوکندریایی را افزایش داد، اختلاف پتانسیل غشا خارج میتوکندری‌ها افزایش یافته و منافذ MPT باز می‌شوند. در نتیجه سیگنالینگ‌های مرگ سلولی نیز افزایش یافته و موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی خواهد شد (۲۸). استرس اکسایشی می‌تواند تعدادی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را در سلول فعال یا مهار کند. در ادامه‌ی کار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را که جزیی از سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی هستند و در سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند، به‌عنوان بیومارکرهایی از استرس اکسایشی بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های سلولی تیمار شده با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی در رده‌ی سلولی نسبت به گروه‌های کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، که این نتیجه احتمالا به خواص آنتی اکسیدانتی ترکیبات مریم‌گلی مربوط می‌شود. این نتیجه نیز در راستای نتایج MTT تاییدی بر اثر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی بود. آنتی اکسیدانت‌ها از بدن در مقابل استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از رادیکال آزاد محافظت می‌کنند. بیماری‌های مختلفی مانند دیابت، امراض قلبی، سرطان، اختلالات مغزی، ضعف سیستم ایمنی و غیره ناشی از استرس اکسیداتیو می‌باشند. در مطالعات انجام شده روی فعالیت آنتی اکسیدانتی بسیاری از گیاهان مانند مریم‌گلی مشاهده شد که ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئیدی موجود در آن‌ها مسئول عمده‌ی خواص آنتی اکسیدانتی و آثار مانده‌یابی رادیکال آزاد هستند ترکیب‌های فنولی مانند کارنوسول، کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید، رزماریال، رزمانول، اپی رزمانول، متیل کارنوسات و لوتئولین فعالیت آنتی اکسیدانتی بالایی دارند و معمولا از عصاره‌ی اتانولی مریم‌گلی استخراج می‌شوند (۱۰). ترکیب‌های فنولی می‌توانند سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی آنزیمی را فعال نموده یا این‌که خود، گونه‌های واکنش‌پذیر را مسیریابی کنند. در پژوهش‌های پیشین نشان داده شد که خواص آنتی اکسیدانتی مریم‌گلی به‌حضور رزمارینیک اسید و کارنوسیک اسید مرتبط می‌باشد به‌علاوه سالویالونیک اسید (که یک دیمر رزمارینیک اسید ایزوله شده از عصاره‌ی مریم‌گلی

است) فعالیت آنتی اکسیدانتی بالایی از خود نشان داده است (۱۰). در یک تحقیق مشاهده شد که پس از نوشیدن چای مریم-گلی به‌مدت دو هفته وضعیت آنتی اکسیدانتی کبد بهبود یافت (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط کوزیکس و همکارانش در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی کبد HepG2 دارد. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که در سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی مریم‌گلی، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز افزایش قابل توجهی داشت اما فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روند رو به کاهش از خود نشان داد. آن‌ها بیان داشتند که ممکن است بالا رفتن فعالیت یک آنزیم کافی باشد و یا این‌که سلول‌ها به‌جای بالا بردن فعالیت آنزیمی، از ویژگی‌های آنتی اکسیدانتی خود گیاه مریم‌گلی استفاده کرده‌اند (۲۳). هم‌چنین هورواتووا و همکاران (۲۹)، یافتند که عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی فعالیت آنتی اکسیدانتی قوی دارد و غنی‌سازی آب آشامیدنی موش‌ها با آن باعث افزایش مقاومت هپاتوسیت‌های موش در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود. نعیمی و همکاران (۱۲) بیان کردند رزمارینیک اسید که یکی از ترکیبات مریم‌گلی است می‌تواند پیشرفت تومور در چندین اندام بدن شامل کولون، سینه، کبد، شکم و همچنین ملانوما و سلول‌های سرطان خون را سرکوب کند. این ماده هم‌چنین می‌تواند فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش دهد. تحقیقات بسیاری حاکی از تاثیر محصولات گیاهی در مهار سلول‌های سرطانی به‌واسطه‌ی افزایش بیان یا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌باشند. به‌عنوان مثال نوعی ایزوفلاوونوئید ضدسرطان، با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در رده سلولی سرطان پروستات باعث مهار موثر این سلول‌ها شد (۳۰). در مطالعه‌ی ما نیز فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در سلول‌های سرطانی ریه A549 تیمار شده با مریم‌گلی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. از این رو می‌توان گفت که عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها سبب مهار سلول‌های A549 شدند. در مطالعه‌ای دیگر که اثر لوتئولین روی رده‌ی سلولی سرطانی HepG2 انجام گرفت، مشخص نمود که لوتئولین قادر است در سلول‌های سرطانی HepG2 آپوپتوزیس را القا کند (۳۱). در نهایت می‌توان چنان نتیجه گرفت که ترکیبات موثر موجود در عصاره‌ی هیدروالکلی مریم‌گلی مسئول القا مرگ سلولی (احتمالا از نوع آپوپتوزیس) در سلول‌های سرطانی ریه بودند. اگرچه بررسی های بیشتر به‌ویژه در زمینه سیگنالینگ‌های سلولی و مولکولی پیشنهاد می‌شد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دادند که عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی قادر است مرگ سلولی را به‌صورت وابسته به‌دوز و زمان در سلول‌های سرطان ریه A549 القا کند و غلظت مناسب IC50 عصاره مریم‌گلی برای این سلول‌ها ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. به‌علاوه نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های سلولی تیمار شده با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی نسبت به گروه‌های کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، که این نتیجه احتمالا به‌خواص آنتی اکسیدانتی ترکیبات مریم‌گلی مربوط می‌شود.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

منابع

1.Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. BMJ. 2000; 321(7264): 805-8.
2. Kang SM, Sung HJ, Ahn JM, Park JY, et al. The Haptoglobin beta chain as a supportive biomarker for human lung cancers. Mol Biosyst. 2011; 4(7): 1167-75.
3. Liu Y, Bhattarai P, Dai Z, Chen X. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. Chem Soc Rev. 2019; 48(7): 2053-108.
4. Yan Y, Liu L, Xiong H, Miller JB, et al. Functional polyesters enable selective siRNA delivery to lung cancer over matched normal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(39): E5702-10.
5. Ferrone E, Araneo R, Notargiacomo A, Pea M, et al. ZnO Nanostructures and Electrospun ZnO-Polymeric Hybrid Nanomaterials in Biomedical, Health, and Sustainability Applications. Nanomaterials (Basel). 2019; 9(10): 1449.
6. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int. 2019; 43(6): 582-92.
7. Ben Mahmoud L, Mdhaffar M, Ghozzi H, Ammar M, et al. Oxidative Stress in Tunisian Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Involvement in Leukemic Relapse. J Pediatr Hematol Oncol. 2017; 39(3): e124-e30.
8. Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. Cytotoxic activity of Piper cubeba extract in breast cancer cell lines. Nutrients. 2015; 7(4): 2707-18.
9. Jiang Y, Zhang L, Rupasinghe HP. Antiproliferative effects of extracts from Salvia officinalis L. and Saliva miltiorrhiza Bunge on hepatocellular carcinoma cells. Biomed Pharmacother. 2017; 85: 57-67.
10. Ghorbani A, Esmaeilizadeh M. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. J Tradit Complement Med. 2017; 7(4): 433-40.
11. Poulios E, Giaginis C,Vasios GK. Current Advances on the Extraction and Identification of Bioactive Components of Sage (Salvia spp.). Curr Pharm Biotechnol. 2019; 20(10): 845-57.
12. Naimi M, Vlavcheski F, Shamshoum H, Tsiani E. Rosemary Extract as a Potential Anti-Hyperglycemic Agent: Current Evidence and Future Perspectives. Nutrients. 2017; 9(9): 968.
13. Wang H, Mou S, Tu M. Study on the Effect of Nano Albumin Paclitaxel Combined with Carboplatin in the Treatment of Lung Squamous Cell Carcinoma. J Nanosci Nanotechnol. 2020; 20(12): 7439-43.
14. Karachiwala H, Tilley D, Abdel-Rahman O, Morris D. Comparison of Oral versus Intravenous Etoposide in the Management of Small Cell Lung Cancer; A Real-World, Population-Based Study. Clin Respir J. 2020.
15. Abramson JS, Arnason JE, LaCasce AS, Redd R, et al. Brentuximab vedotin, doxorubicin, vinblastine, and dacarbazine for nonbulky limited-stage classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2019; 134(7): 606-13.
16. Erfani Majd N, Azizian H, Tabandeh MR ,Shahriari A. Effect of Abelmoschus esculentus Powder on Ovarian Histology, Expression of Apoptotic Genes and Oxidative Stress in Diabetic Rats Fed with High Fat Diet. Iran J Pharm Res. 2019; 18(1): 369-82.
17. Cherneva E, Pavlovic V, Smelcerovic A, Yancheva D. The effect of camphor and borneol on rat thymocyte viability and oxidative stress. Molecules. 2012; 17(9): 10258-66.
18. Pavlovic V, Cekic S, Kamenov B, Ciric M, et al. The Effect of Ascorbic Acid on Mancozeb-Induced Toxicity in Rat Thymocytes. Folia Biol (Praha). 2015; 61(3): 116-23.
19. Garcia CS, Menti C, Lambert AP, Barcellos T, et al. Pharmacological perspectives from Brazilian Salvia officinalis (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. An Acad Bras Cienc. 2016; 88(1): 281-92.

20. Guzel S, Ozay Y, Kumas M, Uzun C, et al. Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of Salvia kronenburgii Rech. f. and Salvia euphratica Montbret, Aucher & Rech. f. var. euphratica on excision and incision wound models in diabetic rats. Biomed Pharmacother. 2019; 111: 1260-76.
21. Zhou R, Long H, Zhang B, Lao Z, et al. Salvianolic acid B, an antioxidant derived from Salvia militarize, protects mice against gammaradiationinduced damage through Nrf2/Bach1. Mol Med Rep. 2019; 19(2): 1309-17.
22. Abu-Darwish MS, Cabral C, Ali Z, Wang M, et al. Salvia ceratophylla L. from South of Jordan: new insights on chemical composition and biological activities. Nat Prod Bioprospect. 2020; 10: 307-316.
23. Kozics K, Klusova V, Srancikova A, Mucaji P, et al. Effects of Salvia officinalis and Thymus vulgaris on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. Food Chem. 2013; 141(3): 2198-206.
24. Zare Shahneh F, Valiyari S, Baradaran B, Abdolalizadeh J, et al. Inhibitory and cytotoxic activities of salvia officinalis L. Extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis .Adv Pharm Bull. 2013; 3(1): 51-5.
25. Zhang Y, Smuts JP, Dodbiba E, Rangarajan R, et al. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (Rosmarinus officinalis L.) assessed using HPLC. J Agric Food Chem. 2012; 60(36): 9305-14.
26. Akaberi M, Mehri S, Iranshahi M. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from Salvia species. Fitoterapia. 2015; 100: 118-32.
27. Feng XM, Su XL. Anticancer effect of ursolic acid via mitochondria-dependent pathways. Oncol Lett. 2019; 17(6): 4761-7.
28. Bao F, Kang X, Xie Q, Wu J. HIF-alpha/PKM2 and PI3K-AKT pathways involved in the protection by dexmedetomidine against isoflurane or bupivacaine-induced apoptosis in hippocampal neuronal HT22 cells. Exp Ther Med. 2019; 17(1): 63-70.
59. Horvathova E, Srancikova A, Regendova-Sedlackova E, Melusova M, et al. Enriching the drinking water of rats with extracts of Salvia officinalis and Thymus vulgaris increases their resistance to oxidative stress. Mutagenesis. 2016; 31(1): 51-9.
30. Vaiserman A, Koliada A, Zayachkivska A, Lushchak O. Nanodelivery of Natural Antioxidants: An Anti-aging Perspective. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 10(7): 447.
31. Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, et al. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 203(2): 124-31.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2020; 11(2) *Original Article*

Induction of Apoptosis in Human Cancer A549 Cells Through Hydroalcoholic Extract of *Salvia officinalis*

Hoveizi E[1], M.Sc., Pouratar F[1], Kesmati M, Ph.D.[1*], Shahriari A[2]

1. Department of biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

* Email corresponding author: m.kesmati@scu.ac.ir

Received: 25 Jul. 2020 Accepted: 7 Sep. 2020

Abstract

Aim: The purpose of the current study is to investigate the cytotoxic and oxidative effects of Salvia officinalis hydroalcoholic extract on cancer A549 cells.
Material and Methods: The cells were seeded in plates to investigate concentrations of Salvia officinalis extract and MTT measurement was done to determine IC50 concentration and cell viability on days 1, 3, 5, and 7. Moreover, analyses of superoxide dismutase and catalase enzymes involved in oxidative stress pathway, and AO/EB staining for a qualitative investigation of cell lines has been conducted in order to explore the effects of IC50 concentration on apoptosis induction. Also, Giemsa and DAPI stainings were utilized to explore the morphological changes of cell and nucleus..
Results: IC50 concentration of Salvia extract for A549 cells was determined 5 mg/mL. According to the results, Salvia extract reduced the cell viability of A549 cells. Based on the results, Salvia extract had a significantly greater cytotoxic effect compared to the control sample of A549 cell line. Treatment cells indicated some clear and dose-dependent differences at different times. The results of stainings proved the apoptosis induction in the treatment group. Furthermore, regarding the enzyme expression results the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes in the cell groups treated by Salvia extract was significantly increased, compared to the control group.
Conclusion: Consistent with the results of this study, in addition to the anti-oxidative activity Salvia officinalis hydroalcoholic extract revealed significant apoptotic effects on lung cancer cells, considering a time and dose-dependent method.
Keywords: Lung Cancer, *Salvia officinalis*, Apoptosis, Oxidative Stress